Dioxin ELISA Kit -For Gas-/-For Ash- を用いた環境試料の測定

東洋紡績（株）　敦賀バイオ研究所　西井 重明、（株）タクマ　環境エネルギー研究所　藤平弘樹

はじめに

2000年1月にダイオキシン類対策特別措置法が施行され、昨年12月から同法の規制が本格的に実施されました。同法では、地方自治体や事業者に年1回以上のダイオキシン類の測定を義務付けており、その測定には高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計（HRGC/HRMS）が用いられています。HRGC/HRMSを用いた測定法（公定法）は、その装置が高価なだけでなく、分析技術の習熟が困難で、測定結果が得られるまでに長時間（約1ヶ月）を要し、1検体当たりの測定コストが高いといった問題点が指摘されています。したがって、公定法によるダイオキシン類の測定を頻繁に行い、施設の日常的な運転管理や、汚染土壌のスクリーニングを行うことは困難です。

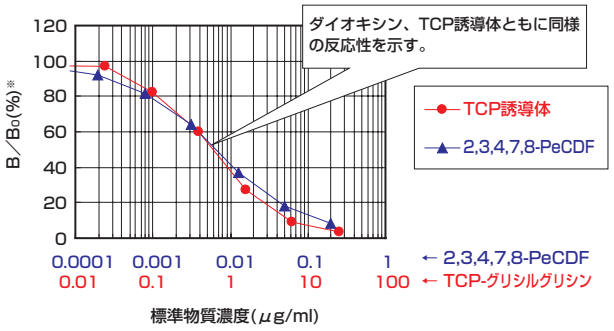
そこで東洋紡と㈱タクマは、短時間で多検体分析が可能で、かつ、1検体当たりの分析費用が安価な測定法として酵素免疫測定法（ELISA法:**E**nzyme-**L**inked **I**mmuno-**S**orbent **A**ssay）に着目し、迅速・簡易・安価にダイオキシン類濃度の測定が可能な測定キットを開発しました。本稿では、本キットの特徴と公定法との相関性について報告します。

キットの特徴

ELISA法で試料中のダイオキシン類濃度（TEQ値）を測定するには、抗ダイオキシン類抗体がTEQ値と相関性の高いダイオキシン類異性体を認識する必要があります。

我々は、公定法で測定したデータを用いて、試料中の各ダイオキシン類異性体濃度とTEQ値との相関性について検討したところ、排ガス試料、灰試料および土壌試料において、五塩素化および六塩素化のジベンゾフラン濃度とTEQ値との相関性が高いことを確認しました。この検討より、試料中の五塩素化および六塩素化ジベンゾフランと特異的に結合する抗ダイオキシン類抗体を開発し、公定法で測定したTEQ値と相関性の高いELISA系の構築に成功しました。

また一般的に検量線作成用の標準物質には毒性の高い2,3,7,8-TeCDDが用いられていますが、本キットでは、新たに開発したTCP-グリシルグリシンを検量線作成用標準物質として用いることで、毒性の高いダイオキシン標準物質を不要とし、その結果、測定者の安全性が大幅に向上しました。TCP-グリシルグリシンとは、2,4,5-トリクロロフェノール誘導体にアミノ酸の一種であるグリシンのジペプチド体を結合させた化合物であり、TEQ値の指標物質として期待されている2,3,4,7,8-PeCDFより約100倍反応性が劣るものの、ダイオキシンと同様の検量曲線を作成することができます（図1）。



【図1】TCP誘導体とダイオキシン類との標準曲線比較

※B／B₀(%)＝各標準物質濃度における吸光度／標準物質ゼロの時の吸光度×100

方　法

同一の排ガス、飛灰および土壌試料を用いて以下の方法により公定法とELISA法による測定値の相関性を検討しました。排ガス試料はJIS法（K0311）に準拠して採取し、排ガス採取後の固相部（円筒ろ紙+XAD-2樹脂）、飛灰および土壌試料のダイオキシン類の抽出にはソックスレー抽出器（溶媒:トルエン）を用いました。その粗抽出液を着色が無くなるまで硫酸処理し、更に多層シリカゲルカラム処理したものをジメチルスルホキシド（DMSO）溶液に転溶し、キット添付の取扱説明書に従ってELISA測定を実施しました。なお公定法では多層シリカゲルカラムからの溶出液の一部を更に活性炭カラム処理し、デカンに転溶したものをHRGC/HRMS測定に用いました。

結　果

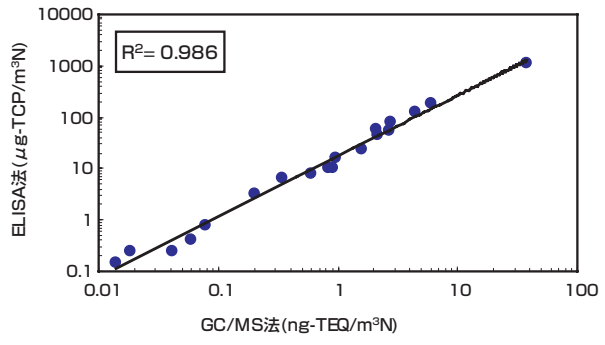
排ガス試料19検体をELISA法と公定法でそれぞれ測定し、相関分析を行った結果、相関係数0.98の有意な正の相関が認められました。同様に飛灰試料8検体および土壌試料6検体の相関分析を行った結果、それぞれ相関係数0.99および0.97の有意な正の相関関係が認められました。以上の結果から、ELISA法による測定値からTEQの算出が可能であることが立証されました（図2、3、4）。

また実際に焼却施設の燃焼管理に本測定法を適用した実施例を表1に示します。データは各プラントの最終出口（煙突）で排ガス中のダイオキシン類を公定法とELISA法により測定した結果ですが、ELISA法での測定結果は同一の試料を公定法で測定した結果と非常に近く、新設施設の排ガスに係る排出基準値（0.1ng-TEQ/m³N）レベルのモニタリングが十分可能でした。

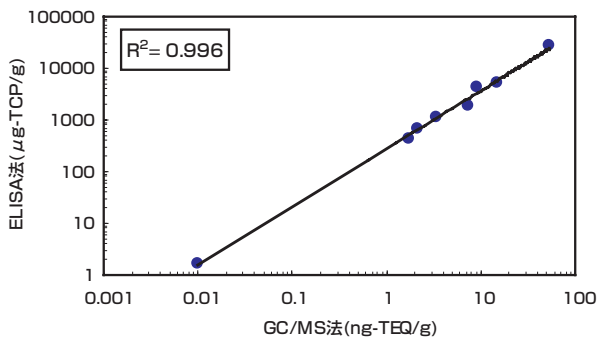
ダイオキシン類の簡易測定法は日本では未だ公定法として承認されていませんが、近年、簡易分析法のニーズや関心の高まりと共に、各省庁および様々な研究機関で簡易測定法の評価検討が行われています。

我々が開発したELISA法は安価で多検体処理が可能であるため、燃焼施設の日常管理や汚染された土壌のスクリーニングに適したものであり、焼却施設の性能評価試験や排ガス処理装置の性能確認試験の場合等、早急にダイオキシン類濃度が知りたい場合にも本測定法の適用が有効です。

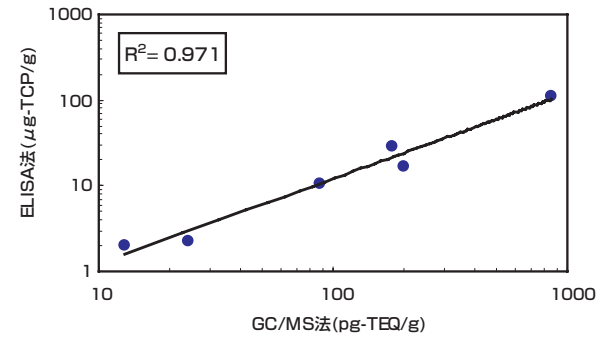
なお本キットを用いた環境試料の受託分析を（株）環境ソルテックにて承っております。ご興味のある方は（株）環境ソルテック（Tel:0794-43-6508）までお問い合わせください。



【図2】排ガス試料における公定法との相関



【図3】飛灰試料中における公定法との相関



【図4】土壌試料における公定法との相関

【表1】

	ELISA法	公定法
A 施 設	0.041	0.025
B 施 設	0.022	0.019
C 施 設	0.14	0.10
D 施 設	0.018	0.018
E 施 設	0.013	0.030
F 施 設	0.019	0.019
G 施 設	<0.010	0.00085

単位:ng-TEQ/m³N

	品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
危	**Dioxin ELISA Kit For Gas（排ガス測定用）**	1プレート(96穴)	2～8℃	DXN-101	¥200,000
危	**Dioxin ELISA Kit For Ash（飛灰・土壌測定用）**	1プレート(96穴)	2～8℃	DXN-201	¥200,000

キットの構成

パーツ	包装	保存温度
抗原固相プレート	96well×1	2～8℃
TCP濃縮標準溶液	1ml×1	
試料希釈用DMSO	8ml×1	
一次免疫反応用緩衝液	8ml×1	
一次抗体溶液	10ml×1	
二次抗体濃縮溶液(100倍濃縮液)	0.15ml×1	

パーツ	包装	保存温度
二次抗体希釈用緩衝液	12ml×1	2～8℃
発色基質液(TMB)	12ml×1	
反応停止液(0.5mol/l 硫酸)	12ml×1	
濃縮洗浄液(10倍濃縮液)	50ml×1	
プレート密閉用シール	1枚	
取り扱い説明書	1部	

関連商品

	品名及び内容	包装	保存温度	Code No.	価格
危	**Ligand Screening System -Androgen Receptor-**	1プレート(96穴)	-80℃、-20℃、4℃	ARA-101	¥88,000
危	**Ligand Screening System -Estrogen Receptorα-**	1プレート(96穴)	-80℃、-20℃、4℃	ERA-101	¥88,000
危	**Ligand Screening System -Estrogen Receptorβ-**	1プレート(96穴)	-80℃、-20℃、4℃	ERB-101	¥88,000
	ビスフェノールA測定ELISAキット	1プレート(96穴)	4℃	BEK-101	¥65,000